

IN VITRO CULTURE OF BUDS ISOLATED FROM AERIAL TUBERS OF BEGONIA EVANSIANA ANDR. (シュウカイ ドウ地上塊茎の芽の無菌培養)

著者	趙 秀采
号	227
発行年	1970
URL	http://hdl.handle.net/10097/23484

氏 名・(本籍)	ちよう 趙	しゆう 秀	さい 采
学 位 の 種 類	理	学	博 士
学 位 記 番 号	理 博 第	2 2 7 号	
学位授与年月日	昭和45年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
研究科専門課程	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)生物学専攻修了		
学 位 論 文 題 目	IN VITRO CULTURE OF BUDS ISOLATED FROM AERIAL TUBERS OF <i>BEGONIA</i> <i>EVANSIANA</i> ANDR. (シュウカイドウ地上塊茎の芽の無菌培養)		
論文審査委員	(主査) 教授 長 尾 昌 之	教授 吉 岡 邦 二 助教授 柴 岡 孝 雄 助教授 相 馬 寛 吉	

論 文 目 次

- I 成熟したシュウカイドウ地上塊茎から切りとった芽の培養
- II 種々の发育段階のシュウカイドウ地上塊茎から分離した芽の培養
- III シュウカイドウ地上塊茎の芽の無菌培養におけるジベレリンの作用

論文内容要旨

生長点分裂組織は植物の形態形成の中心である。これを分離し、無菌的に培養することは、植物の花成や休眠現象などにおいて、生長分裂組織の活動を支配する機構を探求するために非常に有効な解析手段であると考えられる。

シュウカイドウ地上塊茎は短日条件により形成され、成熟すると休眠に入る。これまで、この塊茎休眠の研究は主として全塊茎を用いて行なわれており、かなりの成果が得られているが、まだ十分に解明されていない点が多い。本論文は、前に述べた、生長点分裂組織を培養する方法を用い、個体水準の研究方法では得られない知見を提供する目的で行なわれたものである。

I 成熟したシュウカイドウ地上塊茎から切りとった芽の培養

従来、生長点分裂組織の培養は数多く行なわれているが、大部分は茎頂培養である。ジャガイモでも、塊茎から発芽した茎の茎頂培養が行なわれているが、発芽前の芽の培養実験はみられない。本論文では、シュウカイドウの休眠成熟塊茎と、これを低温処理してその休眠を破った非休眠塊茎から芽を分離し無菌的に培養する方法を述べ、また、この培養芽の発芽に対する培地成分の影響を検討した。

培養に用いた芽は2種で、いずれも生長点分裂組織を含む立方体として塊茎から切りとった。一辺0.5 mm のものをA芽、一辺0.7 mm のものをB芽と名づけた。基本培地としてはホワイトの培地を一部修正したものを用いた。

非休眠塊茎からとったB芽は基本培地上で発芽したが、A芽は発芽しなかった。A芽の発芽にはオーキシン添加が必要であった。いずれの芽の場合にも発芽は明所でのみ可能であった。白色光と数種の単色光を比較した結果、白色光が発芽およびその後の生長に一番有効であった。種々の観点からみて、培養芽の発芽に光を必要とするのは、光合成のためにではなく、光が発芽に不可欠な何らかの物質の形成に関与するためであることが推論された。

基本培地にはショ糖が含まれているが、この代りに各種の糖を用いてその効果を比較した。非休眠芽のB芽での結果によると、糖を含まない培地では発芽は全くおこらない。調べた糖の中では、ショ糖が一番有効であり、グルコース、マンノース、ラフィノースも効果はやや劣るが有効であった。フラクトース培地ではごく僅かしか発芽せず、マルトース、ガラクトース、キシロース、リボースはほとんどが全く無効であった。注目すべきことは、A芽の場合には、B芽に有効であったマンノースが、オーキシンを含む培地中でも発芽に対し無効になることである。このことは、培養芽の大きさが糖利用の面にも影響することを示している。

休眠塊茎のA及びB芽の発芽は基本培地上では困難であるが、培地へのオーキシンやカイネチンの添加によって促進される。基本培地へオーキシンを添加したのみでは、休眠塊茎のA芽の発芽は非休眠塊茎のA芽のそれよりも一般に下まわる傾向がみられたが、グルタチオンやココナッ

トミルク (CM) 等の添加により著るしく促進された。しかし、グルタチオンは単独では効果なく、オーキシンの効果を増加させるにすぎない。またオーキシンと CM をある濃度で組み合わせると、培養芽の下部よりカルス生長がおこり、白化した葉が出現するなど、発芽に有益でなかった。

培養芽の発芽後にはこれら物質の継続的な供給は必ずしも必要でない。オーキシン等の生長調節物質は、少くとも培養初期において培養芽の第一葉の発生にとくに重要な働きをすることが考えられた。

II 種々の発育段階のシュウカイドウ地上塊茎から分離した芽の培養

以上述べた如く、成熟地上塊茎から切りとった 0.5 mm 立方体の芽は適当に培養することにより完全な植物体に生育する。このことは地上塊茎の生長点分裂組織は、母塊茎から切り離しても、適当なホルモンと栄養条件が与えられれば器官形成を始めうることを示している。

ところで、この塊茎は短日条件下で形成され、その発育の進行にともなって休眠状態に入ることが知られている (江刺 1962)。本研究は、この植物の塊茎休眠についてさらに知見を加えるために行なったものである。

長日条件下で前培養した切枝植物を数日おきに短日下に移し、数種の発育段階の地上塊茎を同時に得た。これらの塊茎より一辺 0.5 mm 及び 1.0 mm の立方体の芽を切り出し、これらをそれぞれ S 芽及び L 芽とした。発育段階の異なる塊茎から切りとった L 芽を光照射下の基本培地上で培養した結果、材料塊茎の発育が進むにつれて発芽率が減少した。これは塊茎の発芽とよく似た傾向である。しかし、S 芽について、オーキシンを含む培地で同様な実験を行なうと、L 芽の場合と全く逆の傾向を示し、材料塊茎の発育が進むにつれて発芽率が増加した。この傾向は、オーキシンを含む培地にさらにグルタチオンを添加した場合でも、2% のココナットミルク (CM) を基本培地に添加した場合でも変らなかった。しかし、8% の CM を培地に加えた場合には、未熟塊茎の S 芽の発芽が著るしく促進された。基本培地中のショ糖をフラクトースにかえた場合には、CM は発芽を促進することはできなかった。CM を添加した培地でも、暗所では培養芽の発芽はおこらないから、CM は光に代りうる作用は持っていないと考えられる。

以上の結果から、移植片の発芽がその大きさ及び材料塊茎の発育段階と密接な関係のあることが明らかになった。休眠塊茎からとった L 芽は全塊茎と同様に発芽しないが、S 芽は培地が適当であれば発芽するから、芽自体は休眠していないことを示す。一方、未成熟塊茎の場合には L 芽が S 芽より発芽率が高い。これらのことから、塊茎の発芽は塊茎組織に支配されており、この塊茎組織は、未成熟塊茎の発芽には好影響を与え、成熟塊茎の発芽には抑制的影響を与えることが示唆される。しかし、塊茎組織が僅かしか残っていない S 芽の発芽が材料塊茎の成熟と共に増すことや、前報でみられたように非休眠塊茎の A 芽 (= S 芽) が休眠塊茎の A 芽よりよく発芽することは、生長点分裂組織の性質に変化がおこっている可能性も考えられる。この問題は次のジ

ベレリンの影響に関する研究でも更に論議する。

Ⅲ シュウカイドウ地上塊茎の芽の無菌培養におけるジベレリンの作用

多くの植物の場合と異なり、ジベレリン (GA) はシュウカイドウ地上塊茎の発芽を抑制し、その休眠を誘導または延長する働きがあり (長尾・三井 1959)、生体内の GA が発芽抑制物質の生成に関与して塊茎の休眠誘導をひきおこすことが示唆されている (長尾・岡上 1966)。

塊茎からの移植片は塊茎の発芽とかなり異なった行動を示すことは前に述べたが、培地への GA の添加あるいは材料塊茎の GA 処理が、この移植片の培養において如何なる作用を示すかを調査するのが本論文の目的である。

本実験では、すべて一辺 0.5 mm の大きさの移植片を用いた。低温処理により完全に休眠を破った非休眠塊茎から切りとった芽 (ND 芽) と切枝植物の短日処理により得た休眠成熟塊茎から分離した芽 (D 芽) を各種濃度のナフタレン酢酸 (NAA) と GA の存在する培地上で培養し、その発芽反応を比較した。GA を含まぬ NAA 培地では、NAA 0.001 mg/ℓ の濃度より ND 芽の発芽がおこるが、D 芽は NAA 0.01 mg/ℓ の濃度より発芽を開始する。NAA 培地での発芽は GA の添加により著しく抑えられた。この場合、D 芽は ND 芽より GA による発芽抑制をうけ易い性質を持っていることが認められた。発芽はどほどはっきりしないが、培養芽の不定根の発生も同様な傾向を示した。発育段階の異なる塊茎の芽の培養においては、GA は発育段階に関係なく著しく発芽を抑制した。次に休眠成熟塊茎を 1, 10, 50 及び 100 mg/ℓ の GA 溶液で 80 分間浸漬し、無菌水で洗滌後 1 ないし 7 日後に芽を切り出し、NAA (0.1 mg/ℓ) 培地で培養した。その結果、GA の濃度が高まるにつれ、発芽及び不定根の発生は抑制された。カイネチンによる発芽も GA を同時に培地に添加した場合に抑えられた。次に 2, 3 の生長阻害剤を培地に添加してその発芽に対する影響を調べたが、これらは GA より約 1,000 倍以上の濃度で培養芽の発芽を抑制し始め、しかも、ND 芽と D 芽の発芽抑制度の差はみられなかった。

注目すべき事は、GA の生合成阻害剤として知られている (2-クロロエチル) トリメチルアンモニウムクロライド (CCC) が、オーキシンほどでないが培養芽の発芽を促進することである。発育段階のことなる塊茎の芽を培養においては、より成熟した塊茎の芽の発芽を促進した。この CCC の発芽促進も、同時に添加した低濃度の GA によって完全に打ち消された。これ迄の実験により、大部分の塊茎組織が除去された A あるいは S 芽が、休眠塊茎の場合にさえ適当な培地で発芽することが示された。この事実は、発芽抑制に関与する物質が大部分塊茎組織に含まれている事を示唆する。

しかしながら培養芽の発芽が GA によって抑制され、普通発芽がおこらない基本培地に CCC を添加する事によって、培養芽の発芽がひきおこされることは、GA が関与する抑制物質生成系 (長尾・岡上 1966) が培養芽にまだ残存していることを示唆する。

このような抑制物質の生成が培養芽の分裂組織でおこるのか、なお残存する下部の塊茎貯蔵組織

でおこるのか，あるいは両方で同様におこるのかは本実験では決定できない。この点につきはっきりした結論を得るため，塊茎貯蔵組織を全く含まない，分裂組織のみの培養技術を確立すべく研究中である。

論文審査結果の要旨

シュウカイドウ地上塊茎は短日条件下で形成され、その肥大に伴って次第に休眠状態となる。従来、本塊茎の休眠については主に全塊茎を用いてかなり研究されているが、まだ解明を要する点が多い。本研究は、塊茎から芽を分離して無菌培養し、休眠誘起の機構を追求したもので、3章より成る。

第1章では、成熟塊茎の芽を用いてその培養条件を検討した。休眠塊茎と、低温処理をうけた非休眠塊茎から、生長点分裂組織を含む立方体（主に1辺0.5 mmのものを使用）を切りとり培養した。基本培地として修正ホワイ特培地を用いた。主な結果は次のようである。培養芽の発芽には基本培地にオーキシンまたはカイネチンを添加する必要がある。休眠塊茎の芽は非休眠塊茎の芽より一般に発芽しにくい、グルタチオンまたはココナットミルクの添加で著るしく発芽が促進される。基本培地中の糖としてはショ糖が最適であること、発芽に光を必要とすることを明らかにし、光の役割につき考察している。

第2章では、種々の発育段階の塊茎から1辺0.5mm（S芽）及び1.0mm（L芽）の立方体として分離した芽の培養を行なった。L芽の発芽は材料塊茎の発芽と同じ傾向を示し、材料塊茎の発育に伴ない減少した。S芽の発芽はこれと逆で、材料塊茎の発育につれて増加した。S芽の発芽は8%のココナットミルク添加で著るしく増した。以上の結果は、芽自体は休眠していないこと、塊茎の発芽は塊茎貯蔵組織に支配されていることを示唆する。しかし生長点分裂組織の性質に変化が起っている可能性もあり得ることにつき論議している。

第3章では、培養芽におけるジベレリン（GA）の作用を調べた。多くの場合に休眠打破作用を示すGAが、シュウカイドウ地上塊茎では、逆に休眠を誘起することが知られているが、培養芽においても、全塊茎の場合と同様にGAはその発芽を著るしく抑えることを明らかにした。この結果は、前章の結果と共に、塊茎のどの部分によりその発芽が支配されているかを考察する上に重要な資料となるものである。

以上、本論文は芽だけを分離して無菌的に培養することにより、シュウカイドウ地上塊茎の休眠誘起の機構に関し、従来の全塊茎での実験では得られない新知見を加えただけでなく、一般的に休眠問題の解明に寄与する所が大きい。よって趙秀采提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。